

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 24 年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

白髭 克彦

東京大学分子細胞生物学研究所・教授

エピゲノム解析の国際標準化に向けた新技術の創出

§1. 研究実施体制

(1) 「新規エピゲノム技術開発」グループ

- ① 研究代表者: 白髭 克彦 (東京大学分子細胞生物学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 微量組織からの ChIP-seq 解析法の構築
 - ・ オリゴクローナル抗体の性能評価
 - ・ 新規エピゲノム修飾の同定

(2) 「細胞」グループ

- ① 主たる共同研究者: 和田洋一郎 (東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学部門、特任准教授)
- ② 研究項目
 - ・ 標準エピゲノム解析
 - ・ 病態エピゲノム解析
 - ・ 新規エピゲノム解析手法の開発

(3) 「抗体開発」グループ

- ① 主たる共同研究者: 木村 宏 (大阪大学生命機能研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ オリゴクローナル抗体の開発

(2) 「産総研」グループ (研究機関別)

- ① 研究代表者: 光山統泰 (産業技術総合研究所生命情報工学研究センター、研究チーム長)
- ② 研究項目

- ・ エピゲノムデータベースの構築
- ・ エピゲノム情報解析パイプラインの構築

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

技術の構築、情報基盤の構築は順調に進展した。細胞の調整条件の検討も終わり IHEC 対応のエピゲノム解析にも着手した。如何に詳細を記す。

2.1 新規エピゲノム技術開発グループ

新規エピゲノム技術開発グループはオリゴクローナル抗体開発グループと連携し、微量細胞(1万個細胞)からのエピゲノム解析技術を H3K9 メチル化修飾、H3K27 メチル化修飾、H3K4 メチル化修飾、そして、H3K27 アセチル化修飾についてほぼ構築した(10 の 6 乗細胞を用いた場合の 50%のヒストン修飾部位について疑陽性率 15%で同定可能)(2.3 参照)。現在組織を用いて、本手法の有効性を試すと同時に、情報学的に疑陽性シグナルを除去する為の手法を構築中である。これらと平行して種々のヒストンプロファイルの解析に有効であり、少数細胞データにも対応したエピゲノム解析の為の基本ソフト DROMPA を立ち上げた(1, 2)。現在、細胞グループと連携し、血管内皮細胞の ChIP-seq、FAIRE 解析に着手している。新規エピゲノム修飾については、コヒーシンのアセチル化酵素およびアセチル化修飾についてその転写制御との連携について引き続き解析を行なっている。

2.2 細胞グループ

細胞グループは従来主に臍帯静脈内皮細胞や大動脈、冠動脈内皮細胞におけるトランスクリプトーム及びエピゲノム解析を行っていたが、新規エピゲノム技術開発グループと共により多くの内皮細胞におけるエピゲノム解析を行うこと、また正常と病態エピゲノムの差異を明らかにする事、そしてエピゲノム解析に新たな手法を導入することを目標とした。今年度における進捗状況、成果、及び今後の見通しは以下の通りである。

① 標準エピゲノム解析:

各種臓器由来の内皮細胞のうち、対象細胞を6種類程度に選別し、IHEC 指定のエピゲノム情報を得ることを目的とし、今年度は、11 種類の内皮細胞[皮膚微小血管(HDMEC)、腸骨動脈(HIAEC)、冠動脈(HCAEC)、臍帯静脈(HUVEC)、肺動脈(HPAEC)、大動脈(HAoEC)、心微小血管(HMVEC-C)、腓腹筋静脈(HSVEC)、皮膚リンパ管内皮(LMVC-Ad)、子宮微小血管(UtMVEC)、肺微小血管(HMVEC-L)]を入手し、マイクロアレイ、mRNA-seq によりこれらを分類した。其の結果、いずれの方法によっても、弾性動脈群(HPAEC, HAoEC 等)、筋性動脈群(HIAEC, HCAEC 等)、微小循環群(HMVEC-C, LMVC-Ad 等)、臍帯静脈の4つのグループに分類され、2つの異なるグループ間では H3K4me3 の分布に違いが認められた。引き続き脳血

管、腎血管を加えた解析を実施する一方で、上記 4 群を代表する細胞から新規エピゲノム技術開発グループと共に IHEC に準じた解析を進めている。

また、生体内の情報を維持する培養方法の検討を行った結果、VEGF を低濃度として培養し、市販細胞凍結液を用いない方法で保存した場合、生体から最初に培養された内皮細胞に一番近いプロフィールが維持されており、今後同様の方法で細胞を初代培養することとした。

② 病態エピゲノム解析:

今年度は東京大学及び連携機関における倫理委員会にヒト組織を用いたエピゲノム解析の計画を申請し、先端研で一件、協力研究機関二件において承認された。今後必要臓器に応じて機関を追加する。

③ 新規エピゲノム解析手法の開発:

網羅的なクロマチン相互作用解析を行い、炎症性刺激をうけた内皮細胞というモチーフにおいて、クロマチン構造がダイナミックに変動している様子を観察し報告した(3)。しかし、現在の手法では大量の検体を必要とする等の問題点があり、改善を目指す。

2.3 抗体開発グループ

本年度は、IHEC 標準修飾のうち H3K9me3 と H3K27me3 に関して、抗体の特異性の検討を行った。昨年度の研究により、我々が開発した H3K9me3 及び H3K27me3 抗体は、市販のポリクローナル抗体に比較して高い特異性を持つことがウェスタンブロットリングや修飾ペプチドアレイによって確認された。本年度は、H3K9me3 抗体 3 種類、H3K27me3 抗体 3 種類、それらを混合したオリゴクローナル抗体、及び市販ポリクローナル抗体を用いた ChIP-seq による解析を新規エピゲノム技術開発グループと共に行った。その結果、H3K9me3 と H3K27me3 に対するモノクローナル抗体とオリゴクローナル抗体は、市販ポリクローナル抗体よりも高い特異性で ChIP-seq に適用できると考えられた。また、H3K27ac や H3K4me1 などの他の修飾に対しても、同様の開発を行っている。また、これまで得られている抗体をドイツやカナダの IHEC グループに送付し、評価を受けた。

2.4 産総研グループ

今年度は、昨年度に引き続きエピゲノムデータベース構築のための基盤整備を行った。

① エピゲノムデータベースの開発

国際的な連携を考慮したデータベース開発のため、今年度は米国 Epigenome Roadmap Project の Data Coordination Center である Baylor College of Medicine が開発した Genboree ワークベンチ(データベースと解析パイプラインを統合したウェブアプリケーション)を導入した(「Genboree 基本システムの導入作業」、「Genboree 新機能追加と更新作業」、「Genboree データベース更新作業」)。これによって、国内グループによるエピゲノム測定データを当エピゲノムデータベースに登録し公開した時点で、米国側の Genboree に瞬時に情報が反映され(人手によるデータのダウンロードなどが不要)、そのままウェブ上で比較解析などが可能とな

る。また米国のグループが公開したエピゲノムデータと国内のデータとを比較解析することも同様に容易である。このサービスは、<http://genboree.cbrc.jp/>にて公開中である。尚利用に関してはユーザ登録が必要である。

データベースへのデータ登録としては、新規エピゲノム技術開発グループから公開可能な 12 個のデータについて登録し公開している。また、データベースに登録されたエピゲノムデータを実験種別とサンプル種別に分類して一覧するためのマトリックス表示画面を開発した。この画面は <http://epigenome.cbrc.jp/ihec/matrix/>にて公開中である。

② エピゲノム情報解析パイプラインの開発

DNA メチル化解析で用いられる Bisulfite-seq 手法によって得られた DNA メチル化情報解析パイプラインとして新規手法「**Bisulfighter**」を開発した。本パイプラインは、入力配列とリファレンスゲノムからメチル化されたシトシンを網羅的に検出し、各シトシンでのメチル化率を推定する機能と、2 つのメチル化サンプルを比較して、優位にメチル化の変化が生じている領域を自動的に検出する機能を有する。後者については類似手法がほぼ存在しない。我々が行った DNA メチル化シミュレーションを用いたベンチマーク結果では、前者の機能については、本新手法が最も高い精度(感度と特異度)を示した。後者の機能については、唯一の類似手法である BSmooth に比べてより多くメチル化変化領域を検出することができた。このような高い性能を実現できたのは、入力配列であるショートリードをリファレンスゲノムへマッピングする際に生じる誤りがメチル化シトシン推定に極力影響しないよう工夫した点と、メチル化変化領域を検出するために隠れマルコフモデルに基づいて新しい検出技術を開発した点にある。本手法の概要について図 1 に示す。現在論文準備中であり、詳細はウェブサイト <http://epigenome.cbrc.jp/bisulfighter/> を準備中である。

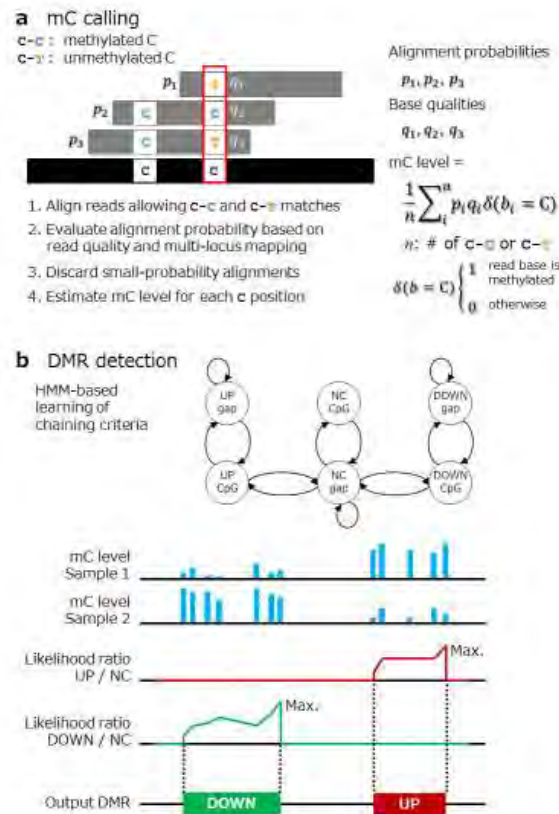


図 1. Bisulfighter の処理概要

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Nakato R, Itoh T, Shirahige K. DROMPA: easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data. Genes to Cells. (in press)
2. Yamaji M, Ueda J, Hayashi K, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, Nakato R, Yamada Y, Shirahige K, Saitou M. PRDM14 Ensures Naive Pluripotency through Dual Regulation of Signaling and Epigenetic Pathways in Mouse Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell. 2013 Mar 7;12(3):368-82. (doi: 10.1016/j.stem.2012.12.012.)
3. Papantonis A & Kohro T (共同筆頭著者), Baboo S, Larkin JD, Deng B, Short P, Tsutsumi S, Taylor S, Kanki Y, Kobayashi M, Li G, Poh H, Ruan X, Aburatani H,

- Ruan Y, Kodama T, *Wada Y(共同責任著者), *Cook PR. TNF α signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. *EMBO J* 2012, 28;31(23):4404-14. (doi: 10.1038/emboj.2012.288.)
4. Pandya K & Kohro T, Mimura I, Kobayashi M, *Wada Y(共同責任著者), Kodama T, *Smithies O. Distribution of histone3 lysine 4 trimethylation at T3-responsive loci in the heart during reversible changes in gene expression. *Gene Expr* 15: 183-198, 2012.
 5. Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro J, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, *Kodama T, *Wada Y(共同責任著者). Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol* 32: 3018-3032, 2012. (doi: 10.1128/MCB.06643-11.)
 6. Tamir Chandra, ... Hiroshi Kimura (29 人中 27 番目), ... and Masashi Narita, “Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation”, *Molecular Cell*, vol. 47, No 2, pp203-214, 2012 (DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.010)
 7. Ryu-suke Nozawa, Koji Nagao, Ken-taro Igami, Sachiko Shibata, Natsuko Shirai, Naohito Nozaki, Takashi Sado, Hiroshi Kimura, and Chikashi Obuse, “Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1–HBIx1 pathway”, *Nature Structural and Molecular Biology* (in press)